

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. August 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/065425 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08B 35/06,
A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/000488

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Januar 2004 (22.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 02 520.0 23. Januar 2003 (23.01.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS
GMBH [DE/DE]; Industriestrasse 1-3, 61191 Ros-
bach-Rodheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SOMMERMEYER,
Klaus [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H.
(DE).

(74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; John-F.-
Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CARBOXYLIC ACID DIESTERS, METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF AND METHODS FOR THE
PRODUCTION OF PHARMACEUTICAL ACTIVE SUBSTANCES COUPLED TO FREE AMINO GROUPS WITH POLYSAC-
CHARIDE OR POLYSACCHARIDE DERIVATIVES

(54) Bezeichnung: KOHLENSÄUREDIESTER, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND VERFAHREN ZUR HER-
STELLUNG VON MIT POLYSACCHARIDEN ODER POLYSACCHARID-DERIVATEN AN FREIEN AMINOGRUPPEN GE-
KOPPELTEN PHARMAZEUTISCHEN WIRKSTOFFEN

(57) Abstract: The invention relates to carboxylic acid diesters of starch fractions or starch fraction derivatives in addition to solids
and solutions containing said carboxylic acid diesters. The invention also relates to methods for the production of said carboxylic
acid diesters, methods for the production of pharmaceutical active substances coupled to free amino functions with polysaccharides
or polysaccharide derivatives and pharmaceutical substances thus obtained.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Kohlendäurediester von Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Deri-
vaten sowie Feststoffe und Lösungen, die diese Kohlendäurediester enthalten. Des weiteren beschreibt die vorliegende Erfindung
Verfahren zur Herstellung dieser Kohlendäurediester, Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Deriva-
ten an freien. Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen sowie hierdurch erhältliche pharmazeutische Wirkstoffe.

WO 2004/065425 A1

**Kohlensäurediester, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verfahren zur
Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien
Aminogruppen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen**

Die vorliegende Erfindung betrifft Kohlensäurediester, Feststoffe und Lösungen, die diese Ester enthalten sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminogruppen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen, die unter Verwendung der Kohlensäurediester durchgeführt werden, sowie die pharmazeutischen Wirkstoffe, die durch diese Verfahren erhältlich sind.

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("PEGylierung") oder Polysacchariden wie Dextrane oder insbesondere Hydroxyethylstärke ("HESylierung") hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung.

Oft haben solche Proteine eine zu kurze biologische Halbwertszeit, welche durch Kopplung an die oben angeführten Polymeren-Verbindungen wie PEG oder HES gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden.

In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO)

über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke durchgeführt werden kann mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B.

Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch Gründen der Denaturierung der Proteine, stehen auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu zur Verfügung. Z.B. gelingt die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Hydroxyethylstärke durch Vermittlung von wasserlöslichem Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (PCT/EP 02/02928). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine verursachen als Nebenreaktionen.

Im Falle von phosphatgruppenhaltigen Verbindungen wie Nukleinsäuren gelingt die Kopplung oft gar nicht, da die Phosphatgruppen mit EDC ebenfalls reagieren können (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1993, Seite 199).

In Anbetracht des diskutierten Standes der Technik lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die unter Vermeidung der zuvor beschriebenen Nachteile die Kopplung von Polysacchariden oder deren Derivate an Aminogruppen-haltige Wirkstoffe, insbesondere an Proteine, in rein wässrigen Systemen oder auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasser gezielt ermöglichen.

Ferner sollte eine solche Verbindung so beschaffen sein, dass eine möglichst quantitative Anbindung eines Wirkstoffes durch kovalente Bindung an ein Polysaccharid oder ein Polysaccharid-Derivat stattfindet.

Der Erfindung lag weiterhin die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zu schaffen, die eine möglichst schonende Verknüpfung von einem Polysaccharid oder eines Derivats hiervon an den Wirkstoff ermöglichen. So sollte insbesondere die Struktur, die Aktivität und die Verträglichkeit des Wirkstoffes durch die Umsetzung möglichst wenig verändert werden. Beispielsweise sollten intra- und intermolekulare Vernetzungsreaktionen vermieden werden. Darüber hinaus sollten auch Wirkstoffe verknüpft werden können, die Phosphatgruppen aufweisen.

Des weiteren war es mithin Aufgabe der vorliegenden Erfindung Verbindungen anzugeben, an die Wirkstoffe in einer vorgegebenen Menge gekoppelt werden können. So sollte insbesondere eine gezielte Stöchiometrie des Konjugats eingestellt werden können, wobei speziell die Herstellung von Konjugaten durch den Einsatz dieser Verbindungen ermöglicht werden sollte, die einen hohen Anteil an Wirkstoff aufweisen.

Schließlich lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde ein möglichst einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Herstellung solcher Verbindungen und Kopplungsprodukte von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten mit Wirkstoffen zur Verfügung zu stellen.

Gelöst werden diese Aufgaben sowie weitere, die zwar nicht wörtlich genannt werden, sich aber aus den hierin diskutierten Zusammenhängen wie selbstverständlich ableiten lassen oder sich aus diesen zwangsläufig ergeben, mit den in Anspruch 1 beschriebenen Kohlensäurediestern. Zweckmäßige Abwandlungen dieser erfindungsgemäßen Kohlensäurediester sowie haltbare und in Verfahren zur Herstellung von Konjugaten einsetzbare Kohlensäurediester werden in den auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüchen 2-19 unter Schutz gestellt.

Hinsichtlich eines Verfahrens zur Herstellung der Kohlensäurediester liefern die Ansprüche 20-24 eine Lösung der zugrunde liegenden Aufgabe.

Die Ansprüche 25-30 beschreiben Verfahren zur Herstellung Polysaccharid-Wirkstoff-Konjugate und die durch diese Verfahren erhältlichen pharmazeutischen Wirkstoffe.

Durch die Bereitstellung von Kohlensäurediester, die von Polysacchariden oder Polysaccharide-Derivaten abgeleitet sind, gelingt es Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die die zuvor genannten Aufgaben lösen. Sie setzen sich im wässrigen Milieu mit nukleophilen NH_2 -Gruppen zu Urethanen um.

Des weiteren werden durch die vorliegende Erfindung unter anderem folgende Vorteile erzielt:

Die erfindungsgemäßen Kohlensäurediester ermöglichen eine leichte Anbindung eines Wirkstoffes durch kovalente Bindung an ein Polysaccharid oder ein Polysaccharid-Derivat stattfindet.

Die Kohlensäurediester der vorliegenden Erfindung können unter schonenden Bedingungen mit einem Wirkstoff umgesetzt werden. Hierbei wird insbesondere die Struktur, die Aktivität und die Verträglichkeit des Wirkstoffes durch die Umsetzung nur in einem geringen Umfang verändert. Hierdurch können unter anderem insbesondere intra- und intermolekulare Vernetzungsreaktionen vermieden werden. Des weiteren können pharmazeutische Wirkstoffe gekoppelt werden, die Phosphatgruppen aufweisen, ohne dass diese Gruppen verändert werden.

Die erfindungsgemäßen Kohlensäurediester erlauben eine sehr schonende Kopplung an den Wirkstoff. Des weiteren kann beispielsweise eine gezielte Stöchiometrie des gewünschten Konjugats eingestellt werden, wobei speziell die

Herstellung von Konjugaten durch den Einsatz dieser Verbindungen ermöglicht wird, die einen hohen Anteil an Wirkstoffen umfassen.

Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung einfache und kostengünstige Verfahren zur Herstellung aktivierter Kohlensäurediester und Kopplungsprodukte von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten mit Wirkstoffen zur Verfügung.

Die Kohlensäurediester der vorliegenden Erfindung sind von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten abgeleitet. Derartige Polysaccharide, sowie hieraus erhältliche Derivate, sind in der Fachwelt weithin bekannt und können kommerziell erhalten werden. Polysaccharide sind makromolekulare Kohlenhydrate, deren Moleküle eine große Zahl (mind. >10, gewöhnlich jedoch erheblich mehr) glykosidisch miteinander verknüpfter Monosaccharid-Moleküle (Glykose) aufweisen. Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts bevorzugter Polysaccharide liegt vorzugsweise im Bereich von 1500 bis 1000000 Dalton, besonders bevorzugt 2000 bis 300000 Dalton und ganz besonders bevorzugt im Bereich von 2000 bis 50000 Dalton. Das Molekulargewicht M_w mit üblichen Verfahren bestimmt werden. Hierzu gehören beispielsweise wässrige GPC, HPLC, Lichtstreuung und dergleichen.

Über das Molekulargewicht des Polysaccharidrests kann unter anderem die Verweilzeit im Körper verändert werden.

Zu den bevorzugten Polysacchariden gehören Stärke sowie die durch Hydrolyse erhältlichen Stärkefraktionen, die als Abbauprodukte von Stärke aufgefasst werden können. Stärke wird üblich in Amylose und Amylopektin unterteilt, die sich im Verzweigungsgrad unterscheiden. Erfindungsgemäß ist Amylopektin besonders bevorzugt.

Unter Amylopektinen versteht man dabei zunächst ganz allgemein verzweigte Stärken oder Stärkeprodukte mit α -(1-4)- und α -(1-6)-Bindungen zwischen den Glucosemolekülen. Die Verzweigungen der Kette erfolgen dabei über die α -(1-6)-Bindungen. Diese sind bei natürlich vorkommenden Amylopektinen etwa alle 15-30 Glucosesegmente unregelmäßig vorhanden. Das Molekulargewicht von natürlichem Amylopektin liegt sehr hoch im Bereich von 10^7 bis zu 2×10^8 Dalton. Man geht davon aus, dass auch Amylopektin in gewissen Grenzen Helices bildet.

Man kann für Amylopektine einen Verzweigungsgrad definieren. Das Maß für die Verzweigung ist das Verhältnis der Zahl von Molekülen Anhydroglucose, die Verzweigungspunkte (α -(1-6)-Bindungen) tragen, zur Gesamtzahl Moleküle der Anhydroglucose des Amylopektins, wobei dieses Verhältnis in mol-% ausgedrückt wird. In der Natur auftretendes Amylopektin weist Verzweigungsgrade von ca. 4 mol-%. Bevorzugt zur Herstellung der Kohlensäurediester eingesetzte Amylopektine weisen eine mittlere Verzweigung im Bereich von 5 bis 10 mol% auf.

Des weiteren können hypervverzweigte Amylopektine eingesetzt werden, die einen über den aus der Natur für Amylopektine bekannten Verzweigungsgrad signifikant hinausgehenden Verzweigungsgrad aufweisen. Dabei handelt es sich beim Verzweigungsgrad in jedem Falle um einen Mittelwert (mittleren Verzweigungsgrad), da Amylopektine polydisperse Substanzen sind.

Solche hypervverzweigte Amylopektine weisen signifikant höhere Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Verzweigungsanhydroglucosen, auf im Vergleich zu unverändertem Amylopektin bzw. Hydroxyethylstärke und sind demzufolge in ihrer Struktur dem Glycogen ähnlicher.

Der mittlere Verzweigungsgrad der hypervverzweigten Amylopektine liegt üblich im Bereich zwischen > 10 und 25 mol%. Dies bedeutet, dass diese Amylopektine im Mittel etwa alle 10 bis 4 Glucoseeinheiten eine α -(1-6)-Bindung und damit einen Verzweigungspunkt aufweisen.

Eine bevorzugt im medizinischen Bereich einsetzbare Amylopektintype kennzeichnet sich durch einen Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-%.

Weitere bevorzugte hypervverzweigte Amylopektine besitzen einen Verzweigungsgrad im Bereich zwischen 13 und 16 mol-%.

Die in der Erfindung einsetzbaren Amylopektine besitzen vorzugsweise einen Wert für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts M_w im Bereich von 2.000 bis 800.000 Dalton, insbesondere 2.000 bis 300.000 und besonders bevorzugt 2.000 bis 50.000 Dalton.

Die zuvor dargelegten Stärken können kommerziell erhalten werden. Des weiteren ist deren Gewinnung literaturbekannt. So kann Stärke, insbesondere aus Kartoffeln, Tapioka, Maniok, Reis, Weizen oder Mais gewonnen werden. Die aus diesen Pflanzen erhaltenen Stärken werden vielfach zunächst einer hydrolytischen Abbaureaktion unterworfen. Dabei wird das Molekulargewicht von etwa 20.000.000 Dalton auf mehrere Millionen Dalton reduziert, wobei ein weiterer Abbau des Molekulargewichts auf die zuvor genannten Werte ebenfalls bekannt ist. Besonders bevorzugt können unter anderem Wachsmaisstärke-Abbaufractionen zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kohlensäurediester eingesetzt werden.

Die zuvor dargelegten hypervverzweigten Stärkefraktionen werden unter anderem in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschrieben.

Des weiteren können auch Derivate von Polysacchariden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kohlensäurediester eingesetzt werden. Zu diesen gehören

insbesondere Hydroxyalkylstärken, beispielsweise Hydroxyethylstärke und Hydroxypropylstärke, die durch Hydroxyalkylierung aus den zuvor dargelegten Stärken, insbesondere aus Amylopektin gewonnen werden können. Hiervon ist Hydroxyethylstärke (HES) bevorzugt.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine HES eingesetzt, die das hydroxethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin ist. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in α -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und α -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen.

HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8, 1987) Seite 271 – 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung / Drug Res., 41, (1991) Seite 494 – 498).

HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht M_w , das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts M_n , die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

Der Substitutionsgrad MS (molar substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucoseeinheit. Er wird ermittelt aus der Gesamtanzahl der Hydroxyethylgruppen in einer Probe, beispielsweise nach Morgan, durch Ätherspaltung und anschließender

quantitativer Bestimmung von Ethyliodid und Ethylen, die hierbei gebildet werden.

Hingegen ist der Substitutionsgrad DS (degree of substitution) definiert als der Anteil der substituierten Anhydroglucoseeinheiten aller Anhydroglucoseeinheiten. Ihn kann man bestimmen aus der gemessenen Menge der unsubstituierten Glucose nach Hydrolyse einer Probe. Aus diesen Definitionen ergibt sich, dass $MS > DS$. Für den Fall, dass nur Monosubstitution vorliegt, also jede substituierte Anhydroglucoseeinheit nur eine Hydroxyethylgruppe trägt, ist $MS = DS$.

Ein Hydroxyethylstärkerest weist bevorzugt einen Substitutionsgrad MS von 0,1 bis 0,8 auf. Besonders bevorzugt weist der Hydroxyethylstärkerest einen Substitutionsgrad MS von 0,4 bis 0,7 auf.

Die Reaktivität der einzelnen Hydroxygruppen in der unsubstituierten Anhydroglucoseeinheit gegenüber Hydroxyethylierung ist je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich. Innerhalb gewisser Grenzen ist dadurch das Substitutionsmuster, also die einzelnen, unterschiedlich substituierten Anhydroglucosen, die statistisch auf die einzelnen Polymermoleküle verteilt sind, beeinflussbar. Vorteilhaft werden überwiegend die C₂- und die C₆-Position hydroxyethyliert, wobei die C₆-Position aufgrund ihrer leichteren Zugänglichkeit häufiger substituiert wird.

Vorzugsweise verwendet werden im Rahmen dieser Erfindung überwiegend in C₂-Position substituierte Hydroxyethylstärken (HES), die möglichst homogen substituiert sind. Die Herstellung solcher HES wird in EP 0 402 724 B2 beschrieben. Sie sind innerhalb einer physiologisch vernünftigen Zeit restlos abbaubar und weisen auf der anderen Seite dennoch ein steuerbares Eliminationsverhalten auf. Die überwiegende C₂-Substitution macht die Hydroxyethylstärke relativ schwierig abbaubar für α -Amylase. Es ist von Vorteil, dass möglichst keine innerhalb der Polymermoleküle hintereinander substituieren

Anhydroglucoseeinheiten auftreten, um die restlose Abbaubarkeit zu gewährleisten. Weiterhin besitzen solche Hydroxyethylstärken trotz der niedrigen Substitution eine ausreichend hohe Löslichkeit in wässrigem Medium, so dass die Lösungen auch über längere Zeiträume stabil sind und sich keine Agglomerate bzw. Gele bilden.

Bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten weist ein Hydroxyethylstärkerest bevorzugt ein Verhältnis von C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2 bis 15 auf. Besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis von C₂:C₆-Substitution 3 bis 11.

Neben dem Polysaccharid umfassen die erfindungsgemäßen Kohlensäurediester eine weitere von einem Alkohol abgeleitete Gruppe. Der Begriff Alkohol umfasst Verbindungen, die HO-Gruppen aufweisen, wobei bevorzugte Alkohole sich von den Polysacchariden oder deren Derivaten unterscheiden. Die HO-Gruppen können unter anderem an ein Stickstoffatom oder an einen Phenylrest gebunden sein.

Bevorzugt werden azide Alkohole eingesetzt, die in der Fachwelt bekannt sind. Hierzu gehören unter anderem N-Hydroxy-Imide, beispielsweise N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole und Hydroxy-Azole, beispielsweise Hydroxy-Benzotriazol, wobei N-Hydroxy-Succinimide und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid besonders bevorzugt sind.

Weitere geeignete azide Alkohole zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kohlensäurediester sind in der Literatur aufgeführt. (V.H.L. Lee. Ed. Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, 1991, S. 65).

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alkohole eingesetzt, deren HO-Gruppe einen pK_s-Wert im Bereich von 6 bis 12, bevorzugt im Bereich von 7 bis 11 aufweist. Dieser Wert bezieht sich auf die bei 25°C

bestimmte Säure-Dissoziationskonstante, wobei dieser Wert vielfach in der Literatur aufgeführt ist.

Das Molekulargewicht des Alkohols liegt vorzugsweise im Bereich von 80 bis 500 g/mol, insbesondere 100 bis 200 g/mol.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Kohlensäurediester kann über an sich bekannte Verfahren erfolgen. Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen Kohlensäurediester eingesetzt, deren Alkoholkomponenten sich von den Polysacchariden oder deren Derivaten unterscheiden. Diese Verbindungen ermöglichen eine besonders schnelle und schonende Reaktion, wobei lediglich Alkohole und der gewünschte Kohlensäurediester gebildet werden.

Bevorzugte Kohlensäurediester sind unter anderem N'N-Succinimidylcarbonat und Sulfo-N'N-Succinimidylcarbonat.

Diese Kohlensäurediester können in relativ geringen Mengen eingesetzt werden. So kann der Kohlensäurediester in 1- bis 3-molarem Überschuss, bevorzugt 1 bis 1,5 molarem Überschuss, bezogen auf das Polysaccharid und/oder das Polysaccharid-Derivat, eingesetzt werden. Die Reaktionsdauer bei Verwendung von Kohlensäurediestern ist relativ gering. So kann die Reaktion vielfach nach 2 Stunden, bevorzugt nach 1 Stunde beendet werden.

Je nach gewünschter Stöchiometrie können auch größere Mengen eingesetzt werden. Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt das Verhältnis von Kohlensäurediester zu Polysaccharid und/oder Polysaccharid-Derivat bei der Umsetzung im Bereich von größer 3:1 bis 30:1, bevorzugt 4:1 bis 10:1.

Die Umsetzung zum erfindungsgemäßen Kohlensäurediester findet bevorzugt in einem wasserfreien aprotischen Lösungsmittel statt. Der Wassergehalt sollte vorzugsweise höchstens 0,5 Gew.-%, besonders bevorzugt höchstens 0,1 Gew.-% betragen. Geeignete Lösungsmittel sind unter anderem Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid (DMA) und/oder Dimethylformamid (DMF).

Die Umsetzung zum Kohlensäurediester gelingt unter schonenden Bedingungen. So können die zuvor beschriebenen Reaktionen bei Temperaturen vorzugsweise im Bereich von 0°C bis 40°C, besonders bevorzugt 10°C bis 30°C durchgeführt werden.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung erfolgt die Umsetzung bei einer geringen Basenaktivität. Die geringe Basenaktivität kann durch Zugabe der Reaktionsmischung in einen 10-fachen Überschuss Wasser gemessen werden. Hierbei weist das Wasser vor Zugabe einen pH-Wert von 7,0 bei 25°C auf, wobei das Wasser im wesentlichen keinen Puffer enthält. Durch Messung des pH-Wertes bei 25°C nach Zugabe der Reaktionsmischung erhält man die Basenaktivität der Reaktionsmischung. Vorzugsweise weist diese Mischung nach Zugabe einen pH-Wert von höchstens 9,0, besonders bevorzugt von höchstens 8,0 und besonders bevorzugt von höchstens 7,5 auf.

Die durch die zuvor beschriebene Umsetzung erhaltenen Lösungen können ohne Isolation der Kohlensäurediester in den Kopplungsreaktionen eingesetzt werden. Da in der Regel das Volumen der voraktivierten Kohlensäurediester im aprotischen Lösungsmittel klein ist im Vergleich mit dem im Puffervolumen gelösten Zielprotein wirken sich die Mengen an aprotischem Lösungsmittel meistens nicht störend aus. Bevorzugte Lösungen umfassen mindestens 10 Gew.-% Kohlensäurediester, bevorzugt mindestens 30 Gew.-% Kohlensäurediester und besonders bevorzugt mindestens 50 Gew.-% Kohlensäurediester.

Die Kohlensäurediester können aus der Lösung in aprotischem Lösungsmittel, beispielsweise DMF, durch bekannte Fällungsmittel, wie beispielsweise trockenes Ethanol, Isopropanol oder Aceton gefällt und durch mehrfaches wiederholen des Vorganges gereinigt werden. Bevorzugte Feststoffe umfassen mindestens 10 Gew.-% Kohlensäurediester, bevorzugt mindestens 30 Gew.-% Kohlensäurediester und besonders bevorzugt mindestens 50 Gew.-% Kohlensäurediester.

Solche Kohlensäurediester können dann in Substanz isoliert zur Kopplung, beispielsweise zur HESylierung verwendet werden. Dabei treten dann keine Nebenreaktionen wie oben beschreiben mit EDC-aktivierter Säure auf.

Des weiteren kann zur Kopplung eine Lösung der aktivierten Kohlensäurediester von Polysacchariden und/oder Polysaccharid-Derivaten zu einer wässrigen Lösung des pharmazeutischen Wirkstoffs, die vorzugsweise gepuffert ist, bei einem geeigneten pH-Wert zugegeben werden. Die pharmazeutischen Wirkstoffe umfassen mindestens eine Aminogruppe, die zum Urethan von Polysacchariden und/oder Polysaccharid-Derivaten umgesetzt werden kann. Zu den bevorzugten Wirkstoffen gehören Antibiotika, insbesondere Amphotericin B, sowie Proteine und Peptide.

Der pH-Wert der Umsetzung ist von den Eigenschaften des Wirkstoffs abhängig. Vorzugsweise, falls dies möglich ist, liegt der pH-Wert im Bereich von 7 bis 9, besonders bevorzugt 7,5 bis 8,5.

Die Kopplung findet im allgemeinen bei Temperaturen im Bereich von 0°C bis 40°C, bevorzugt 10°C bis 30°C statt, ohne dass hierdurch eine Beschränkung erfolgen soll. Die Reaktionsdauer kann durch geeignete Verfahren leicht ermittelt werden. Im allgemeinen liegt die Reaktionszeit im Bereich von 10 Minuten bis 100 Stunden, vorzugsweise 30 Minuten bis 5 Stunden.

Das molare Verhältnis von Kohlensäurediester zu Wirkstoff kann in einem weiten Bereich liegen. Je nach beabsichtigter Stöchiometrie kann der Kohlensäurediester in 1 bis 5-fachem molaren Überschuss, besonders bevorzugt 1,5 bis 2-fachen Überschuss, bezogen auf den pharmazeutischen Wirkstoff, eingesetzt werden. Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung kann der pharmazeutische Wirkstoff in 2 bis 20-fachem molaren Überschuss, besonders bevorzugt 3 bis 10-fachen Überschuss, bezogen auf den Kohlensäurediester, eingesetzt werden.

Als Nebenprodukt fällt bei der oben genannten Umsetzung im wesentlichen nur der Alkohol, beispielsweise N-Hydroxy-Succinimid an, welches leicht vom Kopplungsprodukt abgetrennt werden kann, z. B. durch Ultrafiltration.

Als Nebenreaktion kann eine Verseifung der Kohlensäurediester mit Wasser auftreten, wobei die eingesetzten Polysaccharide und/oder Polysaccharid-Derivate, freier Alkohol sowie CO₂ gebildet werden. Besonders überraschend ist daher, dass die erfindungsgemäßen Kohlensäurediester zu einem großen Teil eine Kopplungsreaktion mit einem pharmazeutischen Wirkstoff eingeht. Dies ergibt sich aus den Beispielen.

Nachfolgend wird die Erfindung durch Beispiele und Vergleichsbeispiele eingehender erläutert, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele beschränkt werden soll.

Beispiele und Herstellverfahren

Beispiel 1

Herstellung von HES 10/0,4 – Kohlensäurediester des N-Hydroxy-Succinimids

5 g getrocknete Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht $M_w = 10.000$ Dalton und einem Substitutionsgrad $MS = 0,4$ werden in 30 ml trockenem Dimethylformamid bei 40 °C gelöst und nach Abkühlen der Lösung mit der äquimolaren Menge an N,N'-Disuccinimidylcarbonat versetzt unter Feuchtigkeitsausschluß. Nach 2 Stunden rühren bei Raumtemperatur wird der gebildete Kohlensäurediester des N-Hydroxysuccinimids und HES direkt weiterverarbeitet wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 2

Herstellung von HES 10/0,4 – gekoppeltem Myoglobin

5 mg Myoglobin werden in 0,4 ml Bicarbonatpuffer 0,3 molar pH 8,4 gelöst. Zu der Lösung werden 0,5 ml der Lösung aus Beispiel 1 mit dem enthaltenen HES 10/0,4 Kohlensäurediester des N-Hydroxysuccinimids über 2 Stunden portionsweise bei Raumtemperatur zugegeben. Der Ansatz wird 1 Stunde rühren gelassen. Die Bildung des hesylierten Myoglobins wird über Gel-Permeationschromatographie mit einer Ausbeute von > 90 %, bezogen auf das eingesetzte Myoglobin, bestimmt.

Beispiel 3

Herstellung von HES 10/0,4 – gekoppeltem Amphotericin B

100 mg Amphotericin B werden in 5 ml trockenem DMSO unter Schutzbegasung mit Argon unter Lichtschutz gelöst.

Zu dieser Lösung gibt man eine nach Beispiel 1 hergestellte Lösung von HES 10/0,4 – Kohlensäurediester des N-Hydroxy-Succinimids, hergestellt mit der doppelten molaren Menge an N.N'-Disuccinimidylcarbonat, und lässt 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtschutz ausreagieren.

Anschließend wird der Ansatz mit 200 ml sauerstofffreiem Wasser unter Argon verdünnt und unter Lichtschutz und Argon ultrafiltriert mit einer Membran des cut offs 1000 Dalton zur Entfernung der Lösungsmittel und des freigesetzten N-Hydroxy-Succinimids.

Der Ansatz wird anschließend gefriergetrocknet zur Isolation des Reaktionsproduktes. Die Charakterisierung des Produktes erfolgt über Gelchromatographie und photometrischer Bestimmung des Anteils gekoppelten Amphotericin B über Photometrie.

Ausbeute bezogen auf eingesetztes Amphotericin B, 90%. Das ermittelte Molekulargewicht betrug 12.000 Dalton und der Anteil des gekoppelten Amphotericin B ca. 20%, entsprechend einem Molverhältnis von 2:1.

Patentansprüche

1. Kohlensäurediester von Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten.
2. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Polysaccharide oder Polysaccharid-Derivate Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivate sind.
3. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen Abbaufractionen des Amylopektins sind.
4. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Abbaufractionen des Amylopektins durch Säureabbau und/oder Abbau durch α -Amylase von Wachsmaisstärke gewonnen werden.
5. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht M_w von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung von 5 – 10 mol% α -1,6-glykosidischen Bindungen.
6. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht M_w von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung im Bereich von >10 bis 25 mol% α -1,6-glykosidischen Bindungen.
7. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Stärkefraktions-Derivate Hydroxyethyl-Derivate von Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind.
8. Kohlensäurediester gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das mittlere Molekulargewicht M_w der Hydroxyethylstärke-Fractionen im

Bereich von 2 – 300.000 Dalton liegt und der Substitutionsgrad MS zwischen 0,1 und 0,8 liegt sowie das C2/C6-Verhältnis der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 der Anhydroglucosen zwischen 2 und 15 liegt.

9. Kohlsäurediester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Alkohol, von dem eine Alkoholkomponente des Kohlsäurediesters abgeleitet ist, ein Molekulargewicht im Bereich von 80 bis 500 g/mol aufweist.
10. Kohlsäurediester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Alkohol, von dem eine Alkoholkomponente des Kohlsäurediesters abgeleitet ist, einen pK_s -Wert im Bereich von 6 bis 12 aufweist.
11. Kohlsäurediester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein Alkohol, von dem eine Alkoholkomponente des Kohlsäurediesters abgeleitet ist, des Kohlsäurediesters eine HO-N-Gruppe oder eine Phenolgruppe umfasst.
12. Kohlsäurediester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein Alkohol, von dem die Alkoholkomponente des Kohlsäurediesters abgeleitet ist, ausgewählt ist aus N-Hydroxy-Succinimid, Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole und Hydroxy-Benzotriazol.
13. Kohlsäurediester gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass ein Alkohol, von dem eine Alkoholkomponente des Kohlsäurediesters abgeleitet ist, N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid ist.

14. Feststoff umfassend mindestens einen Kohlensäurediester gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13.
15. Lösung umfassend mindestens einen Kohlensäurediester gemäß einem mindestens der Ansprüche 1 bis 13.
16. Lösung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mindestens ein organisches Lösungsmittel umfasst.
17. Lösung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung höchstens 0,5 Gew.-% Wasser umfasst.
18. Lösung gemäß mindestens einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung mindestens ein aprotisches Lösungsmittel umfasst.
19. Lösung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid (DMA) und/oder Dimethylformamid (DMF) umfasst.
20. Verfahren zur Herstellung von Kohlensäurediester gemäß mindestens einem der Anspruch 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Polysaccharid und/oder ein Polysaccharid-Derivat mit mindestens einem Kohlensäurediester in aprotischen Lösungsmittel umgesetzt wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass beide Alkoholkomponenten des Kohlensäurediester einen pK_s -Wert im Bereich von 6 bis 12 aufweisen.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man N.N'-Disuccinimidylcarbonat als Kohlensäurediester einsetzt.

23. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 40°C erfolgt.
24. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer geringen Basenaktivität erfolgt.
25. Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an freien Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Kohlendäurediester gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 mit einem pharmazeutischen Wirkstoff umgesetzt, der mindestens eine Aminogruppe aufweist.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in wässrigem Medium erfolgt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des wässrigen Mediums im Bereich von 7 bis 9 liegt.
28. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur im Bereich von 0°C bis 40°C erfolgt.
29. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass der pharmazeutische Wirkstoff ein Polypeptid oder ein Protein ist.

30. Pharmazeutischer Wirkstoff erhältlich durch ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 25 bis 29.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/000488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B35/06 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DD 279 486 A (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 6 June 1990 (1990-06-06) page 3 - page 4 table 6	1-30
X	DE 38 36 600 A (WOLFF WALSRÖDE AG) 3 May 1990 (1990-05-03) column 7, line 2 - line 45 example 9	1-30
X	DE 101 26 158 A (NOVIRA CHEM GMBH) 12 December 2002 (2002-12-12) page 9, line 10 - page 10, line 37 page 4, line 65 - page 5, line 1	1-30
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 2004

Date of mailing of the international search report

09/06/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lensen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/000488

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/000738 A (FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH) 3 January 2003 (2003-01-03) cited in the application page 6, paragraph 3 - page 8, paragraph 2	1-30
A	DE 41 30 807 A (WOLFF WALSRÖDE AG) 18 March 1993 (1993-03-18)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2004/000488

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD 279486	A	06-06-1990	DD 279486 A1	06-06-1990
DE 3836600	A	03-05-1990	DE 3836600 A1	03-05-1990
			DE 58907887 D1	21-07-1994
			EP 0367002 A1	09-05-1990
			US 5068321 A	26-11-1991
DE 10126158	A	12-12-2002	DE 10126158 A1	12-12-2002
WO 03000738	A	03-01-2003	DE 10129369 C1	06-03-2003
			CA 2446205 A1	03-01-2003
			WO 03000738 A2	03-01-2003
			EP 1397162 A2	17-03-2004
DE 4130807	A	18-03-1993	DE 4130807 A1	18-03-1993
			CA 2078164 A1	18-03-1993
			EP 0532995 A2	24-03-1993
			JP 5194601 A	03-08-1993
			US 5484903 A	16-01-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/000488

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C08B35/06 A61K47/48		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiert Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C08B		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	DD 279 486 A (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 6. Juni 1990 (1990-06-06) Seite 3 - Seite 4 Tabelle 6	1-30
X	DE 38 36 600 A (WOLFF WALSRÖDE AG) 3. Mai 1990 (1990-05-03) Spalte 7, Zeile 2 - Zeile 45 Beispiel 9	1-30
X	DE 101 26 158 A (NOVIRA CHEM GMBH) 12. Dezember 2002 (2002-12-12) Seite 9, Zeile 10 - Seite 10, Zeile 37 Seite 4, Zeile 65 - Seite 5, Zeile 1 -/--	1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Mai 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 09/06/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Lensen, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/000488

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/000738 A (FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH) 3. Januar 2003 (2003-01-03) in der Anmeldung erwähnt Seite 6, Absatz 3 - Seite 8, Absatz 2	1-30
A	DE 41 30 807 A (WOLFF WALSRÖDE AG) 18. März 1993 (1993-03-18)	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP2004/000488

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DD 279486	A	06-06-1990	DD	279486 A1	06-06-1990
DE 3836600	A	03-05-1990	DE	3836600 A1	03-05-1990
			DE	58907887 D1	21-07-1994
			EP	0367002 A1	09-05-1990
			US	5068321 A	26-11-1991
DE 10126158	A	12-12-2002	DE	10126158 A1	12-12-2002
WO 03000738	A	03-01-2003	DE	10129369 C1	06-03-2003
			CA	2446205 A1	03-01-2003
			WO	03000738 A2	03-01-2003
			EP	1397162 A2	17-03-2004
DE 4130807	A	18-03-1993	DE	4130807 A1	18-03-1993
			CA	2078164 A1	18-03-1993
			EP	0532995 A2	24-03-1993
			JP	5194601 A	03-08-1993
			US	5484903 A	16-01-1996